聚乙二醇20k修饰与转铁蛋白偶联睫状神经营养因子的生物活性对比研究*

迟胜男[1,2] 李增兰[1,2] 张纯[2**] 殷爽[2] 冯翠[2] 王祺[1,2] 刘永东[2**] 苏志国[2]

1 中国科学院大学，北京，100049

2 中国科学院过程工程研究所，生化工程国家重点实验室，北京 100190

摘要：为了延长重组睫状神经营养因子在体内的保留半衰期，基于CNTF中天然的游离半胱氨酸残基，前期工作中我们采用聚乙二醇修饰和转铁蛋白偶联的两种方式对CNTF进行改造。本研究中我们采用常规分析手段对PEG20k-CNTF和Tf-PEG5k-CNTF进行对比表征。高效凝胶过滤和动态光散射分析结果显示两者拥有相近的表观分子体积。细胞试验结果显示两种耦合物的活性分别下降至未修饰CNTF的50.6%和65.8%。抗体CNTF抗体亲和力结果显示PEG20k修饰后亲合力下降至原蛋白的3.8%，转铁蛋白偶联后保留89.9%原蛋白亲合力。药代动力学结果显示PEG20k-CNTF和Tf-PEG5k-CNTF在SD大鼠血液中的保留半衰期分别为5.34 ± 0.26和8.65 ± 0.60小时，与未修饰rhCNTF相比延长了约21.4倍和34.6倍。药效学结果显示在每周两次每次1.0 mg/kg （rhCNTF等量）的给药频率和剂量，PEG20k-CNTF比Tf-PEG5k-CNTF更显著地降低实验小鼠体重。

关键词：聚乙二醇修饰；转铁蛋白偶联；睫状神经营养因子；减轻体重

睫状神经营养因子(ciliary neuronotrophic factor，CNTF)被认为是一种多功能细胞因子[1]。最初其主要生理功能被认为是一种可促进睫状神经元和脊髓中运动神经元修复的细胞因子，在后来的临床试验中发现其显著抑制试验对象食物摄取，进而导致个体体重下降的活性。进一步研究发现CNTF抑制食欲的机理与瘦蛋白（leptin）的作用机理相似，都是通过作用于位于下丘脑区域的受体，进而抑制机体对食物的摄取。然而，不同的是，CNTF对于具有leptin抗性的饮食诱导肥胖型（Diet-induced obesity, DIO）小鼠模型，仍然具有显著的抑制食欲活性[2]。DIO型肥胖被认为是与人类绝大多数肥胖患者发病机理更为相似。CNTF抑制食

*生化工程国家重点实验室开放基金（NO. 2014KF-05）、国家自然科学基金（NO.21576267）、北京市自然科学基金（NO. 2162041）。

** 通讯作者，电子邮箱：chunzhang@ipe.ac.cn; ydliu@ipe.ac.cn

欲的同时，却不会引发饥饿感，即使在停药后体重不会出现快速反弹。因此 CNTF 在肥胖疾病治疗方面具有巨大的应用潜力。

天然人源 CNTF 分子量约 20k Da，在第 17 位有一个游离的半胱氨酸。尽管其具体的机制仍然不完全清楚，天然人源 CNTF 被发现能够通过一种可饱和的机制（saturable mechanism）从血液中通过血脑屏障进入脑部发挥生理功能[3]，但是 CNTF 在体内血液中的保留半衰期极其短暂，约 2.9 分钟[4]。通过将 CNTF 蛋白 C-末端 15 个氨基酸残基截掉，并将 63 位谷氨酰胺残基替代为精氨酸残基，可在一定程度上提高 CNTF 的生物活性以及在体内的循环保留半衰期。有研究显示持续一周每天给予小鼠这种截短型 CNTF 后，动物体重显著下降。截短型 CNTF 在血液中的保留时间相比于天然 CNTF 延长至约 30 分钟，但仍需要每天注射给药才能维持其生理活性，过于频繁的给药极大地限制了其在临床上疾病治疗的应用[5]。因此，延长 CNTF 在体内的保留半衰期是当前对 CNTF 用于肥胖疾病治疗研究的主要方向。

化学修饰是延长重组药用蛋白在体内循环代谢半衰期最为常用的策略，其中聚乙二醇修饰是目前应用最广泛、技术发展最成熟的修饰技术[6]。聚乙二醇修饰通过增加被修饰蛋白的表观分子体积和对外界的空间位阻效应来实现延缓体内被代谢的速度。我们在前期的工作中已经建立了通过大肠杆菌体系表达以及其纯化制备的工艺[7]，并建立了通过巯基选择性 PEG-maleimide 修饰试剂对 CNTF 的修饰过程以及其纯化方法[8]。聚乙二醇的空间位阻效应在抵御体内各种代谢因素的同时，也可能对 CNTF 渗透血脑屏障的过程可能产生干扰。考虑到转铁蛋白（transferrin，Tf）在体内发挥生理功能的独特性和空间结构的特殊性，以及其在脑部靶向药物递送的应用潜力。因此，我们在前期工作中还建立了通过双端异功能偶联试剂将转铁蛋白与 CNTF 中的游离半胱氨酸定点的修饰方法以及纯化方法[9]。

在本研究中，我们拟从表观分子体积、抗体亲和力、以及实验动物体内药代动力学变化和药效学方面全面对比评价 PEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 耦合物的影响，以及其对 CNTF 脑部递送能力的影响。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 重组人源 CNTF 工程菌（*E. coli*）由北京生物制品研究所提供。

1.1.2 化学试剂

mPEG20k-maleimide 和 Tf-PEG5k-NHS 购自北京键凯科技有限公司，Quantikine® ELISA kit for human CNTF (货号：DNT00，R&D System)，其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要设备

ÄKTA pure（GE Healthcare，美国）；Agilent 1100 高效液相系统（Agilent，美国）。反相色谱柱 C_4（4.6 mm×250 mm）（资生堂，日本），Superdex 200 （10/300 GL） 高效凝胶过滤柱（GE Healthcare，美国）。

1.2 方法

1.2.1 重组 CNTF 的纯化制备

重组 rhCNTF 的表达、纯化和制备主要参考我们前期的工作基础[11]。简言之，大肠杆菌可溶性表达的重组 rhCNTF 破碎上清液经疏水层析、阴离子交换层析和 Ni-亲和介质层析纯化而得。

1.2.2 重组 CNTF 的 mPEG20k-maleimide 修饰

重组 CNTF 的聚乙二醇修饰方法具体参考我们前期的研究基础[8]。简言之，重组 CNTF 蛋白与 mPEG20k-MAL 以 1:3 的摩尔比例（蛋白/PEG）在 50 mM Tris-HCl，pH7.5 缓冲液中反应 16 小时后，通过离子交换层析和凝胶过滤层析纯化获得。

1.2.3 转铁蛋白与 CNTF 的偶联[9]

(1) Tf-PEG5k-MAL 的制备

简言之将终浓度为约 4.0 mg/ml 转铁蛋白溶液放置在 4℃下按摩尔比 1/3（Tf/偶联剂）加入 NHS-PEG5k-MAL 试剂，反应 1 h，使用 DEAE-Sepharose 层析柱去除多余的偶联剂，并浓缩纯化 Tf-PEG5k-MAL 中间体。

(2) Tf-PEG5k-CNTF 的制备

将洗脱下来的 Tf-PEG5k-MAL 与 rhCNTF 蛋白液在 pH7.5 溶液中反应 16 小时。反应结束后，使用 Ni-Sepharsoe FF 层析柱去除转铁蛋白和未偶联 Tf-PEG5k-MAL 中间体，纯化并浓缩 Tf-PEG5k-CNTF 以及多余的 rhCNTF 蛋白。最后使用凝胶过滤色谱将 Tf-PEG5k-CNTF 与多余的 rhCNTF 分离，最终收集

Tf-PEG5k-CNTF，并进行 SDS-PAGE 分析鉴定。

1.2.4 反相液相色谱分析

采用资生堂 proteonavi C4 分析柱(4.6×250 mm)，检测波长为 280 nm，mPEGk0k-MAL-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 进样量都为 100 μl，流动相 A 为超纯水+0.1%三氟乙酸，流动相 B 为乙腈+0.1%三氟乙酸，线性梯度设为 20%-100%，流速 0.5 ml/min，线性梯度时间为 30 分钟。

1.2.5 高效凝胶过滤色谱分析

凝胶过滤使用ÄKTA pure 层析系统和 Superdex 200 （10/300 GL）分析柱，运行缓冲液为 50 mM PB 0.1M Na_2SO_4 pH7.0 缓冲液，流速 0.6 mL/min ，上样量 500 μl，检测波长为 280 nm。

1.2.6 动态光散射（DLS）测定蛋白粒径大小

将样品浓度使用 50 mM PB pH7.0 缓冲液稀释并调节浓度至 0.5 mg/ml。使用 Nano ZSP 动态光散射仪测定样品粒径，吸取 1.5 ml 放入 1.0 cm 光径的比色杯中，设置 3 次扫描重复，粒径大小取三次结果的平均值。

1.2.7 生物活性的考察

TF-1（CN5α-1）细胞测定 rhCNTF 和耦合物生物活性[7-9]。

1.2.8 抗体亲和力测定

使用 human CNTF ELISA 试剂盒，测得 200 ng/ml 浓度的 CNTF、mPEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 对抗 CNTF 抗体的相对亲和力。

1.2.9 大鼠体内代谢动力学试验

体重为 200 g 左右雄性 SD 大鼠 15 只，随机分为三组。分别对其通过尾静脉注射 1.0 mg/kg 剂量(CNTF 当量)的 CNTF、mPEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF。注射后在既定的时间点通过大鼠眼眶静脉每次取血 0.5 ml，37℃下放置 30 分钟后，6000 rpm 下离心获得血清并保存于-70℃至使用前。所有血清采取结束后，使用 human CNTF ELISA 试剂盒测得血清中样品的含量。

1.2.10 小鼠体重减轻试验

体重约 20 g 雄性 C57BL/6 型小黑鼠 24 只，随机均分为四组。将生理盐水，CNTF，mPEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 按 1.0 mg/kg 的剂量（CNTF 摩尔浓度等量）皮下注射，每周两次，食物和饮水保证绝对充足，自由饮食，并用分析

天平每隔一天称取小鼠体重，记录每组小鼠平均体重变化。

1.2.11 荧光活体成像

使用 Cy5.5-NHS 对 mPEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 中的氨基（Cy5.5/蛋白比例 3:1）进行标记，并通过凝胶过滤去除未标记的 Cy5.5 后，对 Balb/c nude 小鼠经尾静脉注射后，在既定时间点使用 Kodak In Vivo Imaging 系统观察小鼠大脑部位的荧光量子强度。

1.2.12 蛋白质浓度测定

测定方法参照 Lowry 法[10]。

2. 结果与分析

2.1 mPEG20k 修饰与转铁蛋白偶联

在修饰剂和 CNTF 使用摩尔比为 3：1 的比例下，蛋白单修饰率高于 75%。通过离子交换柱和凝胶过滤柱两步层析后，RP-HPLC 分析和电泳分析结果显示 mPEG20k-CNTF 的纯度通过灰度扫描估算高于 98%（图 1A, B）。

在转铁蛋白偶联过程中，偶联试剂 NHS 活化酯末端首先与转铁蛋白上的氨基随机连接，控制偶联试剂与转铁蛋白的使用比例（3:1）以及反应条件，可获得转铁蛋白连接一分子偶联剂的修饰产物[9]。结合之前我们建立的耦合物的纯化方法，通过离子交换柱层析（DEAE-Sepharose）结合 Ni-亲和层析和凝胶过滤层析获得 Tf-PEG5k-CNTF 耦合物。偶联反应原蛋白及偶联后层析目标洗脱峰 RP-HPLC 分析和电泳分析结果见图 1A, B。RP-HPLC 分析结果显示最终获得的耦合物纯度高于 90%。

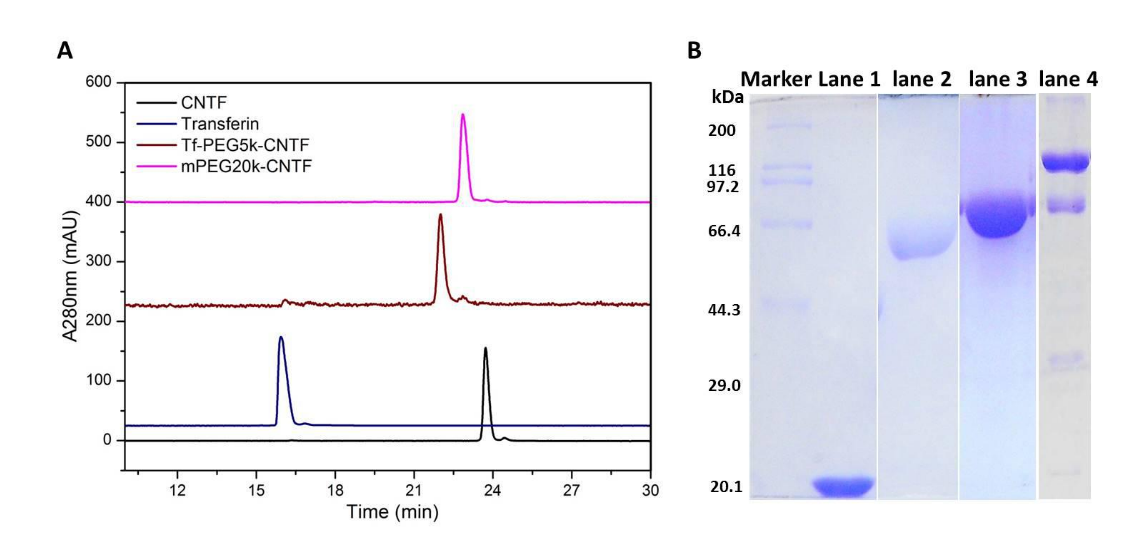


图 1: A，高效液相色谱分析 rhCNTF，转铁蛋白，mPEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 耦合物纯度；B，12%电泳分析结果： lane 1： CNTF 原蛋白； lane 2：mPEG20k-CNTF； lane 3：转铁蛋白；lane 4：Tf-PEG5k-CNTF

Fig.1 A, RP-HPLC analysis of rhCNTF and modified rhCNTF; B, 12% SDS-PAGE analysis of rhCNTF and modified rhCNTF

2.2 高效凝胶过滤分析耦合物表观分子体积

为了对比 mPEG20k 修饰和转铁蛋白偶联对 CNTF 表观分子体积的影响，我们使用了高效凝胶过滤色谱和动态光散射仪进行分析，结果显示相比于未修饰的 rhCNTF，mPEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 耦合物的表观分子体积都显著增大。高效凝胶过滤色谱分析显示两者的表观分子量相近（图 2A）。DLS 分析结果提示 mPEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 耦合物在水相中的粒径都约为 5.0 nm（图 2B）。

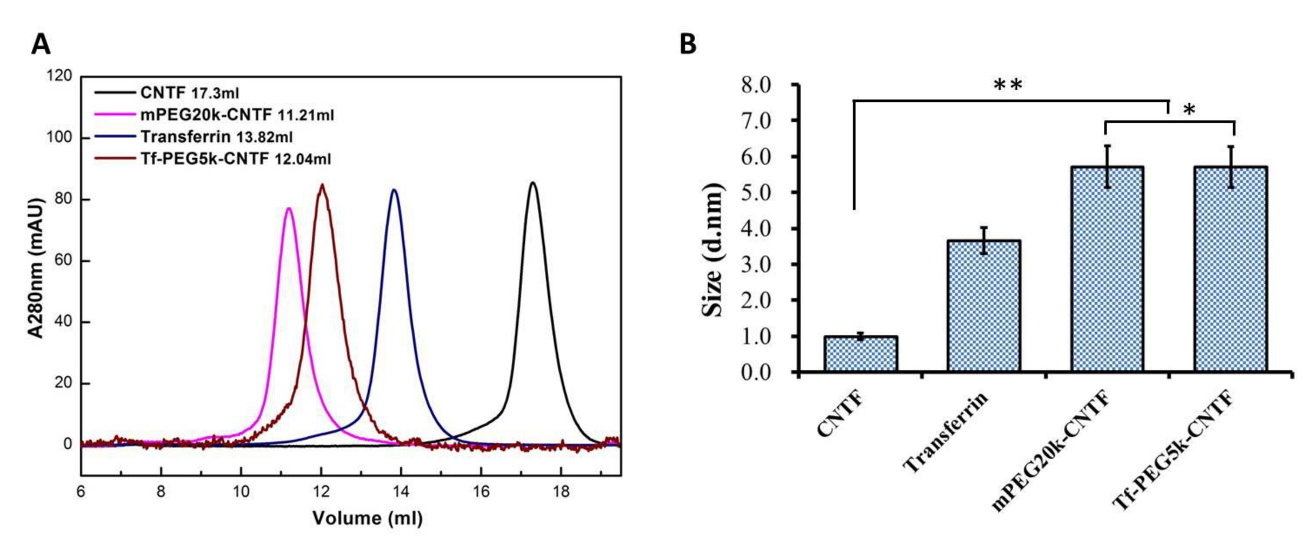


图 2 高效凝胶过滤色谱和动态光散射分析耦合物 (*代表 p >0.05,代表 p<0.05)**

Fig. 2 HP-SEC and DLS analysis of the rhCNTF and the conjugates

2.3 细胞活性试验和抗体亲合力大小

TF-1(CN5α-1)细胞的细胞膜可表达 CNTF-α受体，其增殖分化主要依赖于 GM-CSF 细胞因子的存在，当培养环境中缺乏 GM-CSF 细胞因子时，CNTF 能够短暂维持其生长，且与其浓度相关。基于此，细胞活性试验中，在无 GM-CSF 时，CNTF 的活性可转化为 TF-1(CN5α-1)细胞的存活率。相比于 CNTF，mPEG-20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 耦合物的生物活性都在一定程度上下降，下降至未修饰 CNTF 初始活性的 50.6%和 65.8%。抗体亲合力实验结果显示 mPEG20k-CNTF 与抗 CNTF 抗体的亲合力显著下降至未修饰 rHCNTF 的 3.8%，

与此不同的是 Tf-PEG5k-CNTF 却保留了未修饰 rhCNTF 的 89.9%（图 3）。

图 3　细胞活性测定和抗 CNTF 抗体亲合力大小比较(代表 $p<0.05$)**

Fig 3 Measurement of the TF-1(CN5α-1) cell survival activity and the anti-CNTF antibody binding affinity

2.4 药代动力学试验

使用 ELISA 法测定血清中 CNTF 和 mPEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 在大鼠体内中的保留半衰期，结果如图 4。未修饰的 CNTF 原蛋白在大鼠血液中的保留半衰期约 0.25 ± 0.05 分钟，注射后在 8 小时后，血液中 CNTF 的浓度下降至 ELISA 试剂检测盒灵敏度以下。mPEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 在 SD 大鼠血液中的循环半衰期分别为 5.34 ± 0.26 和 8.65 ± 0.60 小时，与未修饰 CNTF 原蛋白相比较，在血液中的保留半衰期分别延长了约 21.4 倍和 34.6 倍。

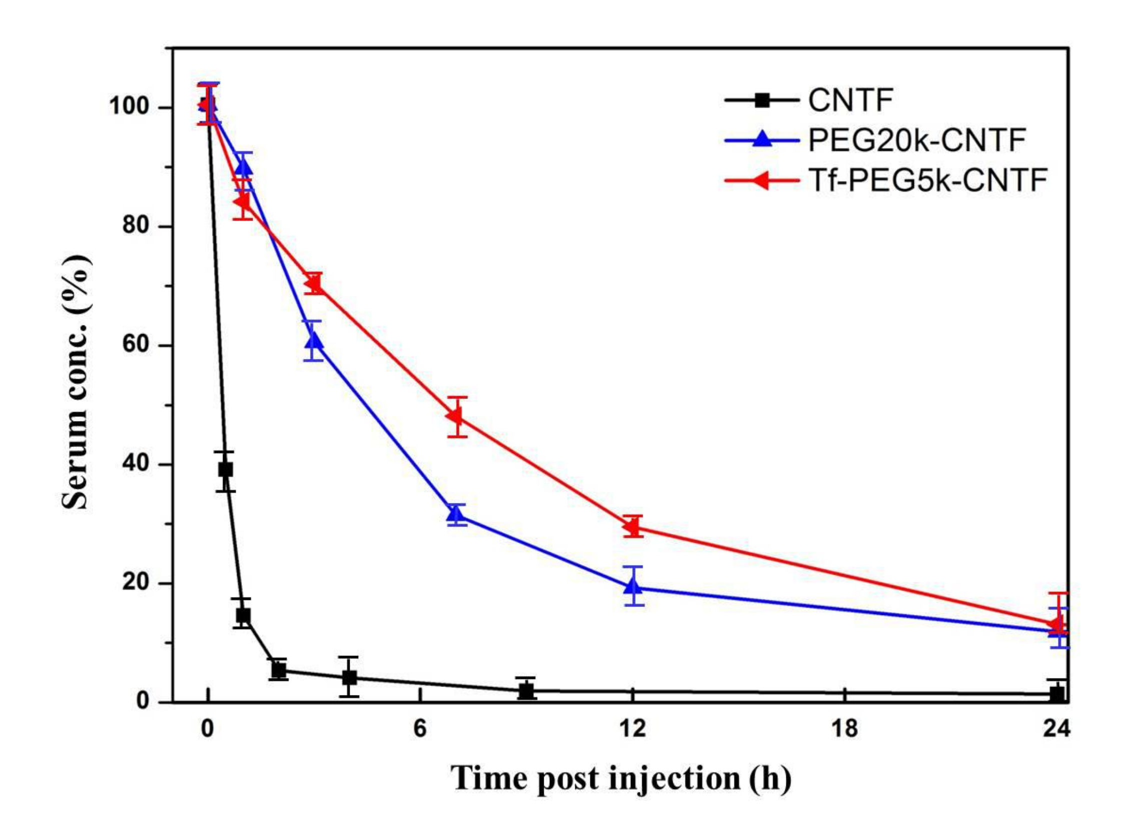


图 4 雄性 SD 大鼠体内药代动力学

Fig. 4 Pharmacokinetics of the rhCNTF and conjugates in SD male rats

2.5 药效学试验

考虑到 DIO 型动物模型不易获得的情况，并且 DIO 型肥胖主要与过量摄取食物相关，而与正常个体在遗传学上并无显著差异，因此我们在体内活性评价中使用了正常小鼠来进行抑制食物摄取减轻体重实验。将生理盐水、未修饰 CNTF、mPEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 以 1.0 mg/kg 的剂量（CNTF 等量）通过 C57 小鼠背部每周两次皮下注射给药，观察并记录每组小鼠在三次给药周期内的体重变化，如图 5。生理盐水组在整个实验过程中，体重略有增加，未修饰 CNTF 组与生理盐水组之间的比较有统计学意义，而与自身体重比较无统计学差异（$p>0.05$）。mPEG20k-CNTF 组和 Tf-PEG5k-CNTF 组较生理盐水组和未修饰 CNTF 组均有显著性差异（$p<0.05$）。Tf-PEG5k-CNTF 组在第二次给药后体重得到了较好的维持（起始重量的 85%。mPEG20k-CNTF 组小鼠体重持续下降，经三次给药周期后小鼠平均体重降低至最初体重的 60%以下。

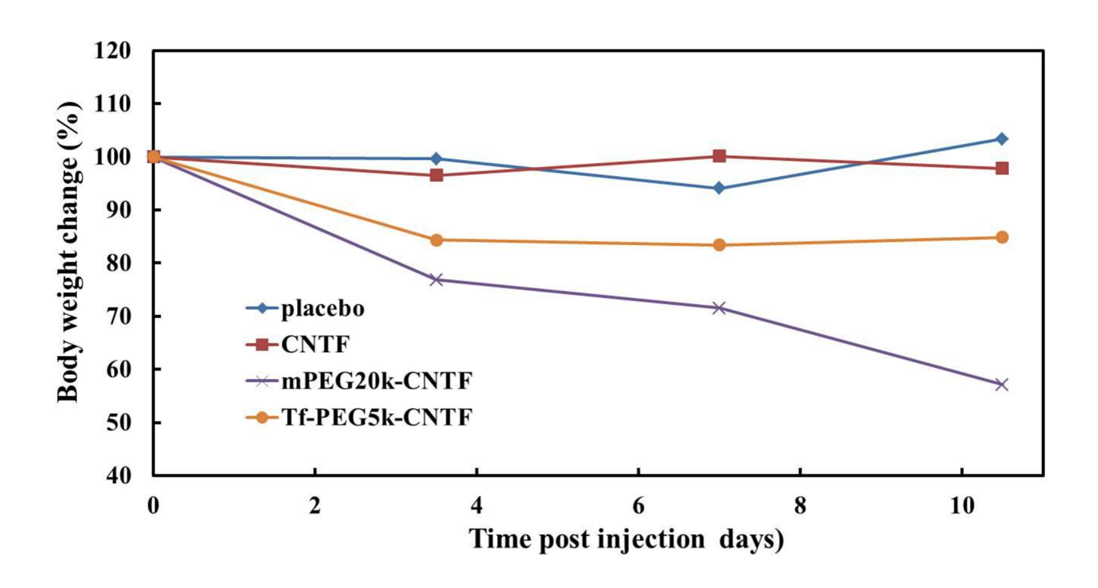


图 5 rhCNTF 和耦合物与对雄性 C57 小鼠体重的影响

Fig. 5 Pharmacodynamics of rhCNTF and mPEG20k-CNTF, Tf-PEG5k-CNTF in C57 male mouse

2.6 小鼠荧光活体成像

为了观察 rhCNTF 及 mPEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 对脑部的递送能力，我们进行了小鼠荧光活体成像实验。结果显示，无论未修饰 rhCNTF 还是修饰耦合物组小鼠的脑部都未出现明显的荧光量子聚集现象。但是在脑部区域仍然观察到和其他周围组织部位相近的荧光强度，提示 rhCNTF 和修饰 rhCNTF 仍然能够渗透进入脑部组织。

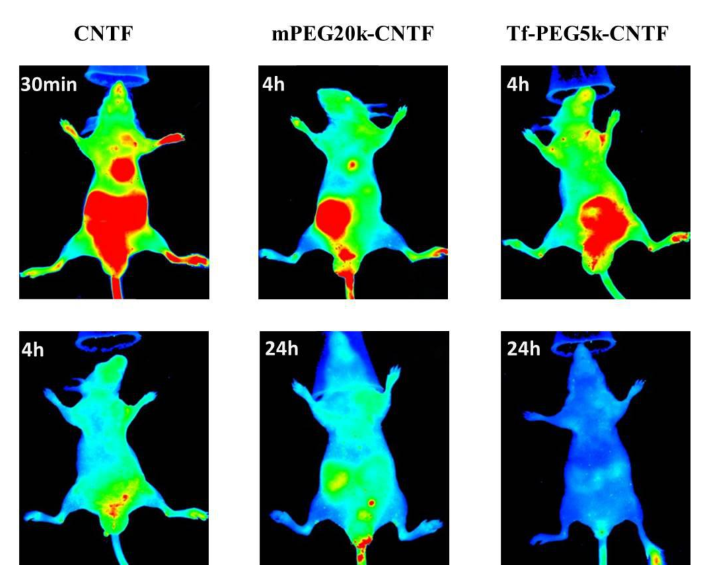


图 6 Cy5.5 标记 rhCNTF 和耦合物在对雄性 Balb/c 裸小鼠体内的荧光发光强度比较

Fig. 6 In vivo imaging of sulfo-Cy5 labeled CNTF, mPEG20k-CNTF and Tf-PEG5k-CNTF on BALB/c nude mice

3 讨论

药用蛋白在临床疾病治疗应用中普遍存在着体内代谢半衰期短的问题。蛋白质的化学修饰是当前最常用的延长半衰期的策略之一，在本研究中，我们使用mPEG20k-MAL对睫状神经营养因子进行定点修饰，以期延长其体内保留半衰期。同时，考虑到睫状神经营养因子在体内发挥生理活性的主要位置在于脑部，以及转铁蛋白在体内参与脑部物质运输过程中扮演的重要角色，因此我们期望通过转铁蛋白偶联的方式来延长睫状神经营养因子在体内的代谢半衰期的同时，提高目标蛋白在脑部的递送能力。

蛋白质经聚乙二醇修饰后，其原有生物活性往往都表现出不同程度的下降。本研究中rhCNTF经mPEG20k修饰后，同样其生物活性明显下降。最大的原因是由于聚乙二醇强大的水合能力促使rhCNTF蛋白表面的空间位阻效应显著增加，干扰了原蛋白与细胞或是抗体间的结合。值得注意的是和PEG20k-CNTF拥有相近表观分子体积的Tf-PEG5k-CNTF耦合物，其在细胞活性保留和抗体亲和力保留方面都显著优于前者。一般认为，聚乙二醇修饰蛋白复合物中PEG链是以一种包裹状态环绕与修饰蛋白表面[11,12]，这其中可能涉及到PEG链自身与蛋白质表面存在着一些非共价相互作用，这种包裹状态的PEG链为修饰蛋白提供了最大限度的空间位阻或空间屏蔽效应（图7A）。而在转铁蛋白耦合物中，转铁蛋白部分与rhCNTF部分两者之间通过偶联剂连接，各自的空间结构相对独立而且紧凑，其空间结构更多可能是呈现一种哑铃状结构（图7B）。虽然耦合物的表观分子体积显著增加，然而rhCNTF周围的屏蔽效应却不如聚乙二醇修饰rhCNTF。因此转铁蛋白偶联修饰rhCNTF在细胞活性保留和抗体亲和力保留方面都有明显的优势。

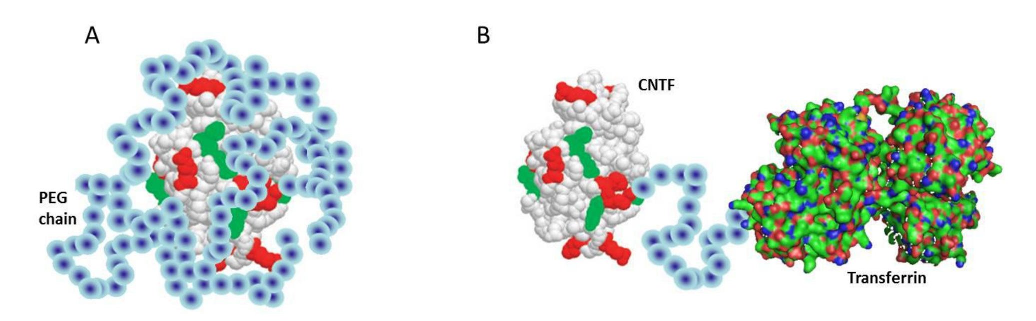


图7 mPEG20k-CNTF与Tf-PEG5k-CNTF空间构象差异示意图；A，PEG链包裹在rhCNTF表面；B，CNTF与转铁蛋白相对独立，呈现哑铃状构象

Fig. 7 Schematic presentation of the spatially morphological difference between mPEG20k-CNTF and Tf-PEG5k-CNTF conjugates

蛋白类药物在体内主要通过肾脏滤过，蛋白酶降解、细胞吞噬等途径被代谢，此外某些蛋白还可能通过自身受体介导的方式被特异性清除[13]。因此任何能够干预这些清除过程或受体结合能力的改造都可能延缓原蛋白的体内清除速度。因此，mPEG20k 修饰和转铁蛋白偶联修饰由于其增大的分子尺寸和空间屏蔽效应，因此能够显著延长 rhCNTF 在大鼠血液中的循环保留时间。值得留意的是相近的分子尺寸而空间屏蔽效应差异显著的两种耦合物却显示出相近的循环半衰期，提示聚乙二醇修饰和转铁蛋白修饰延长 rhCNTF 的代谢半衰期的机理仍然不尽相同。聚乙二醇修饰主要依赖于屏蔽效应，而转铁蛋白除了屏蔽效应之外，还可能存在着电荷排斥效应。不同于中性的 PEG 链，转铁蛋白的等电点较低（约 5.4），在体内血液中带负电荷。rhCNTF 与转铁蛋白偶联后，耦合物被负电化，这种负电性对绝大多数吞噬细胞和血液中的蛋白水解酶都具有静电排斥作用，因此静电排斥作用在一定程度上抵消了转铁蛋白偶联提供的空间屏蔽效应不足的问题。

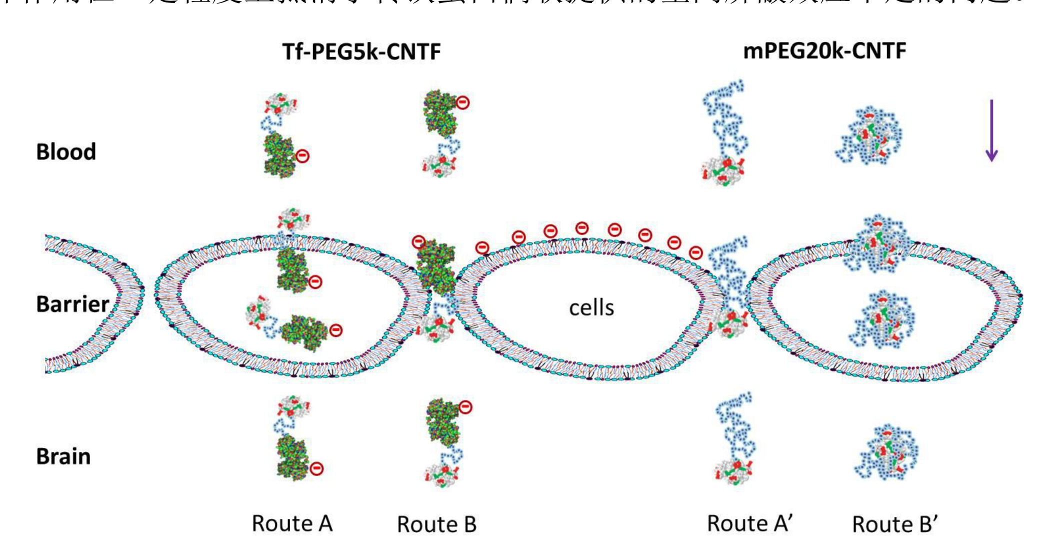


图 8 mPEG20k-CNTF 和 Tf-PEG5k-CNTF 通过血脑屏障的转运方式对比示意图；路线 A，Tf 受体介导转运途径；路线 B，CNTF 自身转运途径；路线 A'，CNTF 自身转运途径；路线 B'，非特异性 PEG 辅助转运途径

Fig. 8 Schematic presentation of the transporting routes difference between mPEG20k-CNTF and Tf-PEG5k-CNTF conjugates

理论上，Tf-PEG5k-CNTF 可通过 CNTF 自身转运途径（饱和机制渗透）和 Tf-TfR 转运途径进入脑部[14]。与 mPEG20k-CNTF 相比，尽管 Tf-PEG5k-CNTF 拥有更高的细胞保留活性和相近的体内循环保留时间，但是其在体内抑制小鼠食

物摄取的活性却明显弱于前者。这表明 Tf-PEG5k-CNTF 耦合物对脑部的渗透能力弱于 mPEG20k-CNTF。在 Tf-PEG5k-CNTF 穿越血脑屏障过程中，转铁蛋白和 CNTF 部分在一定程度上干扰着对彼此的渗透途径（图 8 Route A, B）。而得益于聚乙二醇分子自身良好的生物相容性，聚乙二醇修饰被认为能够辅助部分不具有脑部渗透能力的脑源蛋白穿过血脑屏障[15]。因此 mPEG20k-CNTF 可通过 CNTF 自身饱和机制渗透和非特异性 PEG 辅助转运机制进入脑部（图 8 Route A’, B’）。但是这不能说明聚乙二醇修饰方式比转铁蛋白偶联修饰方式更能高效的实现药物蛋白递送，因为本研究中 CNTF 自身的渗透机制在耦合物的转运过程中扮演着重要的角色。

综上所述，mPEG20k-CNTF 与 Tf-PEG5k-CNTF 具有相似的表观分子体积，但是后者保留更高的生物活性和抗体亲合力。两者都显示出现在延长的体内循环保留半衰期，且能够进入脑部发挥抑制小鼠食物摄取的活性并最终导致体重下降，但是 mPEG20k-CNTF 显示出更强的减轻体重活性。尽管活体成像结果未观察到脑部明显的富集现象，但是我们的结果仍然提示聚乙二醇修饰 CNTF 具有更好的脑部渗透能力。

致谢 感谢生化工程国家重点实验室开放基金（NO. 2014KF-05）、国家自然科学基金资助（NO. 21576267）和北京市自然科学基金（NO. 2162041）。

参考文献

[1] Ding J, He Z, Ruan J, Ma Z, Liu Y, Gong C, Iqbal K, Sun S, Chen H. Role of ciliary neurotrophic factor in the proliferation and differentiation of neural stem cells. J Alzheimers Dis. 2013, 37(3): 587-592.

[2] Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, Wong V, Tan J, Hijarunguru A, Corcoran TL, Murray JD, Thabet KE, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001, 98(8): 4652-4657.

[3] Pan W, Kastin AJ, Maness LM, Brennan JM. Saturable entry of ciliary neurotrophic factor into brain. Neurosci Lett. 1999, 263(1):69-71.

[4] Dittrich F, Thoenen H, Sendtner M. Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. Ann Neurol. 1994, 35(2):151-163.

[5] Misra M. Obesity pharmacotherapy: current perspectives and future directions. Curr Cardiol Rev. 2013, 9(1):33-54.

[6] Veronese FM, Harris JM. Introduction and overview of peptide and protein pegylation. Adv Drug Deliv Rev. 2002, 54(4):453-456.

[7] 冯翠，赵大伟，张纯等. 一种重组人睫状神经营养因子突变体的分离纯化及结构鉴定.中国生物工程杂志, 2013,33(10):21-27.

Feng C, Zhao D W, Zhang C, et al. Purification and Characterization of a New Recombinant Ciliary Neurotrophic Factor Mutant Expressed in Soluble Form by *E. Coli*. Journal of China Biotechnology, 2013, 33(10):21-27.

[8] 冯翠，王祺，张纯等. PEG 定点修饰重组人睫状神经营养因子及其生物活性评价.中国生物工程杂志,2015,35(5):15-21.

Feng C, Wang Q, Zhang C, et al. Preparation of mPEG-MAL-modified Recombinant Human Ciliary Neurotrophic Factor and Evaluation of Biological Activity. Journal of China Biotechnology, 2015, 35(5):15-21.

[9] 殷爽，冯翠，张纯等. 转铁蛋白-PEG-睫状神经营养因子的制备及其生物活性评价。中国生物工程杂志，2016,36（4）：43-49.

Yin S, Feng C, Zhang C, et al. Preparation of Transferrin Conjugated Ciliary Neurotrophic Factor and Evaluation of Biological Activity. Journal of China Biotechnology, 2016, 36(4): 43-49.

[10] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193 (1): 265–75.

[11] Fee CJ, Van Alstine JM. Prediction of the viscosity radius and the size exclusion chromatography behavior of PEGylated proteins. Bioconjug Chem. 2004, 15(6):1304-13.

[12] Chavez M., Morar A, Schrimsher J. PEGylation of proteins: A structural approach. Biopharm Int, 2006, 19(4): 34.

[13] Kumar BS, Sabera K, Abdullah AM, Mamotaz B. Distribution and elimination of protein therapeutics: A review, S. J. Pharm. Sci. 2011, 4(2): 01-12.

[14] Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. Pharmacol Rev. 2002, 54(4): 561-587.

[15] Ankeny DP, McTigue DM, Guan Z, Yan Q, Kinstler O, Stokes BT, Jakeman LB. Pegylated brain-derived neurotrophic factor shows improved distribution into the spinal cord and stimulates locomotor activity and morphological changes after injury. Exp Neurol. 2001, 170(1): 85-100.

Comparison of the Biological Activity of mPEG20k Modified and Transferrin Coupled Ciliary Neurotrophic Factor *

CHI Shengnan[1,2] LI Zenglan[1,2] ZHANG Chun[2**] YIN Shuang[2] FENG Cui[2] WANG Qi[1,2]

LIU Yong-dong[2**] SU Zhiguo[2]

1 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, PR China

2 State Key Laboratory of Biochemical Engineering，Institute of Process Engineering，Chinese Academy of Sciences，Beijing 100190，China;

Abstract: In order to prolong the blood half-life of the recombinant ciliary neurotrophic factor *in vivo*, CNTF was previously formulated by mPEG20k modification and transferrin coupling based on the natural free thiol of Cys17 residue. In this study, we characterized and compared these two conjugates of PEG20k-CNTF and Tf-PEG5k-CNTF using conventional analysis. The HP-SEC and DLS results showed that the conjugates exhibited a similar apparent molecular size. TF-1(CN5α-1) cell survival test showed significant decreased activity of 50.6% (mPEG20k-CNTF) and 65.8% (Tf-PEG5k-CNTF) compared with the unmodified rhCNTF, respectively. Antibody binding affinity revealed that PEG20k-CNTF decreased to 3.8% of the rhCNTF, and Tf-PEG5k-CNTF retained 89.9% of the rhCNTF. Pharmacokinetics study showed that the blood half-lives of PEG20k-CNTF and Tf-PEG5k-CNTF conjugates in vivo were 5.34 ± 0.26 and 8.65 ± 0.60 hours, respectively, which were about 21.4 times and 34.6 times higher than that of rhCNTF. Pharmacodynamics study showed twice weekly administration of 1.0 mg/kg (rhCNTF equivalent) both conjugates led to significant weight-losing, and the efficacy of PEG20k-CNTF group was more potent than that of Tf-PEG5k-CNTF group.

Key words: PEGylation; Transferrin coupling; Ciliary neurotrophic factor; Losing weight

*Open Fund of State Key Laboratory of Biochemical Engineering (China Grant Number: NO. 2014KF-05), National Natural Science Fund of China (NO.21576267), Beijing Natural Science Foundation (Grant No. 2162041).
**Corresponding author, E-mail address：chunzhang@ipe.ac.cn; ydliu@ipe.ac.cn